

基于抑菌实验优化清消五味汤提取工艺

陈新荣 张谦

作者单位: 015000 内蒙古自治区巴彦淖尔, 巴彦淖尔市医院检验科(陈新荣)

010110 内蒙古自治区呼和浩特, 内蒙古医科大学新药安全评价研究中心, 药学院(张谦)

通信作者: 张谦, Email: 89259584@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2022.02.014

【摘要】 目的 基于抑菌实验进行清消五味汤的醇提取工艺优化。方法 采用琼脂打孔法抑菌实验, 以革兰阴性(G^-)菌(大肠杆菌)和革兰阳性(G^+)菌(金黄色葡萄球菌)的抑菌圈直径综合评分作为考察指标, 采用 L9(34) 正交试验设计, 以料液比 A(分别为 1:6、1:8、1:10 kg/L)、提取次数 B(分别为 1、2、3 次)、提取时间 C(分别为 0.5、1、1.5 h)、乙醇浓度 D(分别为 45%、60%、75%)为考察因素, 进行清消五味汤醇提取工艺的优化。**结果** 9 种清消五味汤提取物(a~i)对大肠杆菌均无明显抑制作用, 对金黄色葡萄球菌的抑菌直径分别为提取物 a(10.89±0.23) cm, 提取物 b(14.25±0.55) cm, 提取物 c(16.69±0.79) cm, 提取物 d(13.17±0.34) cm, 提取物 e(14.93±0.37) cm, 提取物 f(15.39±0.88) cm, 提取物 g(14.91±0.26) cm, 提取物 h(14.26±0.54) cm 和提取物 i(16.99±0.71) cm。采用 L9(34) 正交试验确定清消五味汤最优提取工艺为 A3B3C3D3, 即料液比为 1:10 kg/L, 提取次数为 3 次, 提取时间为 1.5 h, 乙醇浓度为 75%。**结论** 实验优化所得的清消五味汤醇提取工艺稳定、可行, 能为清消五味汤的进一步临床应用提供科学依据。

【关键词】 清消五味汤; 抑菌试验; 综合评分; 工艺优化

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2021MS08087); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY21632)

Optimization of extraction process of Qingxiao Wuwei Decoction based on antibacterial experiment

Chen Xinrong, Zhang Qian. Department of Clinical Laboratory, Bayannaer Hospital, Bayannaer 015000, Inner Mongolia Autonomous Region, China (Ch XR); The Center for New Drug Safety Evaluation and Research, School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, Inner Mongolia Autonomous Region, China (Zhang Q)

Corresponding author: Zhang Qian, Email: 89259584@qq.com

【Abstract】 Objective To optimize the alcohol extraction process of Qingxiao Wuwei Decoction based on antibacterial experiment. **Methods** The antibacterial experiment by agar punching method and the comprehensive score of the inhibition zone diameter of Gram-negative (G^-) bacteria (*Escherichia coli*) and Gram-positive (G^+) bacteria (*Staphylococcus aureus*) were used as the investigation indexes. The L9 (34) orthogonal experimental design was adopted and the ratio of solid to liquid A (1:6, 1:8 and 1:10 kg/L, respectively), extraction times B (1, 2 and 3 times, respectively), extraction time C (0.5, 1 and 1.5 h, respectively) and ethanol concentration D (45%, 60% and 75%, respectively) were selected as the investigated factors to optimize the ethanol extraction process of Qingxiao Wuwei Decoction. **Results** Nine kinds of Qingxiao Wuwei Decoction extracts (a-i) had no significant inhibitory effect on *Escherichia coli*, and the antibacterial diameters against *Staphylococcus aureus* were as follows: extract a (10.89±0.23) cm, extract b (14.25±0.55) cm, extract c (16.69±0.79) cm, extract d (13.17±0.34) cm, extract e (14.93±0.37) cm, extract f (15.39±0.88) cm, extract g (14.91±0.26) cm, extract h (14.26±0.54) cm and extract i (16.99±0.71) cm, respectively. At the same time, the L9 (34) orthogonal test was used to determine that the optimal extraction process of Qingxiao Wuwei Decoction was A3B3C3D3 (the solid-liquid ratio was 1:10 kg/L, the extraction times were 3 times, the extraction time was 1.5 h, and the ethanol concentration was 75%). **Conclusion** The optimized alcohol extraction process of Qingxiao Wuwei Decoction is stable and feasible, which can provide scientific basis for the further clinical application of Qingxiao Wuwei Decoction.

【Key words】 Qingxiao Wuwei Decoction; Antibacterial experiment; Comprehensive score; Technology optimization

Fund Program: Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2021MS08087); Higher Education Scientific Research Project of Inner Mongolia Autonomous Region (NJZY21632)

炎症是生物体内最常见和复杂的反应之一,主要是由于某些化学物质或细菌感染引起的细胞损伤或死亡,导致炎症细胞因子〔如白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)〕释放而发生。非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)是广泛使用的炎症治疗药物,由于其强大的抗炎潜力,在炎症治疗中发挥着突出的作用^[1-4]。其中,布洛芬和阿司匹林已成为有效的抗炎药物,它们可能通过抑制环氧合酶(cyclooxygenase, COX)的功能来抑制前列腺素的生物合成^[5]。另一方面,长期使用 NSAIDs 会导致多种不良反应,包括出血、凝血功能障碍、间质性肾炎、胃肠道黏膜损伤以及因前列腺素水平极低引起的过敏反应^[6-7]。传统中草药具有广泛的抗菌谱和低耐药性,这使其成为治疗炎症的理想选择而备受临床青睐^[8]。清消五味汤(主要成分为苦参、蛇床子、大黄、艾叶、冰片)系一临床经验方,在多年临床使用中具有很好的抗炎杀菌效果^[1]。在传统中药中,苦参、蛇床子、大黄、艾叶、冰片可单独或合用,治疗炎症疾病。苦参干药材具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗癌、抗纤维化等特性,还可用于治疗各种免疫系统疾病^[9];蛇床子和大黄主要成分中提取的化合物具有抗菌、抗炎、抗纤维化、抗癌和抗氧化活性^[10-11];艾叶在东南亚地区可用于治疗各种炎症疾病,如皮炎、关节炎和支气管炎等^[12];冰片是一种被广泛使用的食品和化妆品添加剂,具有抗菌、抗炎、镇痛和促进渗透等作用^[13]。临床应用和现有文献表明,清消五味汤无论内服还是外用都具有很好的疗效^[14]。本研究通过琼脂打孔法抑菌实验进行清消五味汤提取工艺的优化,旨在为清消五味汤的进一步临床应用提供科学依据,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 GSP-9270 型细菌培养箱购自上海笃特科学仪器有限公司, AirGuard 1500 型超净工作台购自上海润度生物科技有限公司, BSA2202S 型分析天平购自德国 Sartorius 公司, PHS-3C 型 pH 计购自上海盛磁仪器有限公司, ZNCL-TS-001 型高精度磁力电热套搅拌器购自河南爱博特科技发展有限公司, LB 培养基购自广州环凯微生物科技有限公司, 生理盐水购自四川科伦药业股份有限公司, 无水乙醇购自天津科密欧化学试剂有限公司; 麦氏比浊管购自广州环凯微生物科技有限公司, 培养皿、三

角瓶、烧杯及量筒等购自赣州金昌贸易有限公司。

1.2 药材与菌种 苦参(批号:180601)、蛇床子(批号:180501)、大黄(批号:180601)、艾叶(批号:180601)、冰片(批号:180501)购自保定安国药材市场。标准菌株为大肠杆菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC29213)。

1.3 研究方法

1.3.1 琼脂打孔法抑菌实验 按每 1 000 mL 蒸馏水称取 36 g 粉末配制 LB 培养基, 每个平皿加入 25 mL 培养基分装。将孵育 16~24 h 的菌种分别接种于生理盐水试管中, 校正细菌浓度至 0.5 麦氏单位(相当 1.0×10^8 CFU/mL)。用无菌棉签拭子蘸取菌液, 在试管内壁旋转, 挤去多余菌液后在 LB 培养基表面密集划线接种 3 次, 每次旋转平板 60° , 最后沿平板内缘涂抹 1 周。放置 5 min, 待平板表面水分吸收后, 使用直径为 6 mm 的无菌金属打孔器在平皿内打孔, 除去洞内琼脂, 用微量移液器吸取不同条件下 200 μ L 清消五味汤提取物加入孔内, 于 37°C 培养 16~24 h, 记录抑菌圈直径, 每批重复操作 5 次。

1.3.2 正交优化水提工艺 按处方比例称取苦参 18 g、蛇床子 18 g、大黄 18 g、艾叶 18 g, 选择料液比(A)、提取次数(B)、提取时间(C)、乙醇浓度(D)为考察因素, 采用 L₉(3⁴) 正交实验表。见表 1。将所得滤液浓缩至 72 mL, 加入 0.9 g 冰片, 每批正交实验提取物分别进行琼脂打孔法抑菌实验, 以综合评分为考察指标, 评估清消五味汤提取工艺, 评分越高则表明提取物的抑菌效果越好, 综合评分=(金黄色葡萄球菌抑菌圈直径) \times 50%+(大肠杆菌抑菌圈直径) \times 50%, 确定清消五味汤的最佳提取工艺。

表 1 正交实验表

水平	料液比 (A, kg/L)	提取次数 (B, 次)	提取时间 (C, h)	乙醇体积分数 (D, %)
1	1:6	1	0.5	45
2	1:8	2	1.0	60
3	1:10	3	1.5	75

1.4 伦理学 本研究符合医学伦理学标准, 并经本单位伦理审批(审批号: YKD202201017)。

1.5 统计学分析 使用 SPSS 20.0 软件处理数据。符合正态分布的计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单向方差分析(ANOVA)和 Bonferroni 校正比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 清消五味汤抑菌实验 采用不同工艺所得清

消五味汤提取物 a~i,应用琼脂打孔法对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌分别进行抑菌实验,结果见表 2、图 1。由此可见,料液比为 1:10,乙醇浓度为 75%,提取时间为 1.5 h,提取次数为 3 次的清消五味汤提取物对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,而所有工

表 2 不同工艺清消五味汤提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈直径比较(x±s)

提取物	抑菌圈直径 (cm)		提取物	抑菌圈直径 (cm)	
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌		金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
a	10.89±0.23	6	f	15.39±0.88	6
b	14.25±0.55	6	g	14.91±0.26	6
c	16.69±0.79	6	h	14.26±0.54	6
d	13.17±0.34	6	i	16.99±0.71	6
e	14.93±0.37	6			

注:a为料液比 1:6 kg/L,提取时间 1.0h,提取次数 1 次,乙醇浓度 45%; b为料液比 1:6 kg/L,提取时间 1.0h,提取次数 2 次,乙醇浓度 60%; c为料液比 1:6 kg/L,提取时间 1.5 h,提取次数 3 次,乙醇浓度 75%; d为料液比 1:8 kg/L,提取时间 1.0 h,提取次数 1 次,乙醇浓度 75%; e为料液比 1:8 kg/L,提取时间 1.5 h,提取次数 2 次,乙醇浓度 45%; f为料液比 1:8 kg/L,提取时间 0.5 h,提取次数 3 次,乙醇浓度 60%; g为料液比 1:10 kg/L,提取时间 1.5 h,提取次数 1 次,乙醇浓度 60%; h为料液比 1:10 kg/L,提取时间 0.5 h,提取次数 2 次,乙醇浓度 75%; i为料液比 1:10 kg/L,提取时间 1.0h,提取次数 3 次,乙醇浓度 45%

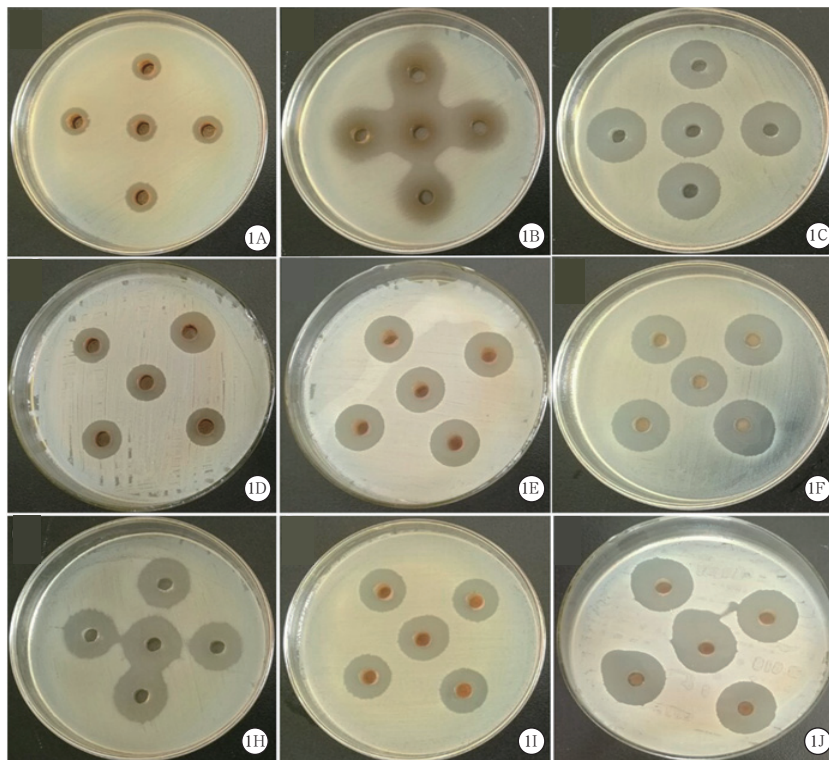
表 3 正交实验的设计与结果

序号	因素				综合得分 (分)
	料液比(A)	提取次数(B)	提取时间(C)	乙醇浓度(D)	
a	1	1	1	1	5.445
b	1	2	2	2	7.125
c	1	3	3	3	8.345
d	2	1	2	3	6.585
e	2	2	3	1	7.465
f	2	3	1	2	7.695
g	3	1	3	2	7.455
h	3	2	1	3	7.130
i	3	3	2	1	8.495
K1	21	19	20	21	
K2	22	22	22	22	
K3	23	25	23	22	
Rj	2	5	3	1	

注:K1、K2、K3 为每个因素在各水平下的指标总和, Rj 为极差, Rj=平均得率最大值-平均得率最小值

表 4 方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 比值	P 值
料液比(A)	0.80	2.00	0.40	5.81	P>0.05
提取次数(B)	4.27	2.00	2.13	31.18	
提取时间(C)	1.54	2.00	0.77	11.23	
乙醇浓度(D)	0.14	2.00	0.07	1.00	



注:1A 为料液比 1:6 kg/L,提取时间 1.0 h,提取次数 1 次,乙醇浓度 45%; 1B 为料液比 1:6 kg/L,提取时间 1.0 h,提取次数 2 次,乙醇浓度 60%; 1C 为料液比 1:6 kg/L,提取时间 1.5 h,提取次数 3 次,乙醇浓度 75%; 1D 为料液比 1:8 kg/L,提取时间 1.0 h,提取次数 1 次,乙醇浓度 75%; 1E 为料液比 1:8 kg/L,提取时间 1.5 h,提取次数 2 次,乙醇浓度 45%; 1F 为料液比 1:8 kg/L,提取时间 0.5 h,提取次数 3 次,乙醇浓度 60%; 1G 为料液比 1:10 kg/L,提取时间 1.5 h,提取次数 1 次,乙醇浓度 60%; 1H 为料液比 1:10 kg/L,提取时间 0.5 h,提取次数 2 次,乙醇浓度 75%; 1I 为料液比 1:10 kg/L,提取时间 1.0 h,提取次数 3 次,乙醇浓度 45%

图 1 不同工艺的清消五味汤提取物对金黄色葡萄球菌的抑制效果

艺提取物对大肠杆菌均不具有抑制作用。

2.2 根据抑菌实验评分和正交实验设计确定最佳提取工艺 根据极差(Rj)大小,确定 B 因素(提取次数)对提取工艺的影响最大,各因素对综合评分影响的主次顺序为: B(提取次数)>C(提取时间)>A(料液比)>D(乙醇浓度),通过 4 因素 3 水平 K 值分析比较可知,料液比 A3>A2>A1,提取次数 B3>B2>B1,提取时间 C3>C2>C1,乙醇浓度 D3=D2>D1。见表 3。根据方差分析,A、B、C、D 因素对药物抑菌程度均无显著影响(P>0.05),可确定清消五味汤最优提取工艺为 A3B3C3D3,即料液比为 1:10 kg/L,乙醇浓度为 75%,提取时间为 1.5 h,提取次数为 3 次。见表 4。

3 讨论

本研究使用不同实验条件下的清消五味汤提取物考察对革兰阴性(Gram negative, G⁻)菌大肠杆

菌和革兰阳性(Gram positive, G⁺)菌金黄色葡萄球菌的抑菌效果,结果表明,所有批次的提取物对大肠杆菌均无抑菌效果,提取时间为 3 h 及以上的提取物对金黄色葡萄球菌有更强的抑制作用;在预实验中我们还对两种不同的抑菌方法(琼脂打孔法和 K-B 纸片扩散法)进行比较,琼脂打孔法负载的提取物药量较多(约 200 μL),K-B 纸片扩散法负载药量较少(约 20 μL),说明清消五味汤需达到一定的剂量和浓度才对细菌有抑制作用。

金黄色葡萄球菌最常从皮炎患者的皮肤微生物群中分离获得^[15]。由于金黄色葡萄球菌感染,皮肤表面的正常微生物群被破坏,微生物的多样性减少^[16]。因此,能够抑制金黄色葡萄球菌的药物在急性慢性皮炎的治疗中可以起到很好的作用,上述结果与本课题组以往临床工作中应用清消五味汤对急性慢性皮炎的治疗效果一致。同时,本研究结果显示,清消五味汤对 G⁺ 菌(金黄色葡萄球菌)的抑制作用强于对 G⁻ 菌(大肠杆菌)的作用。上述结果可能与多重耐药 G⁻ 菌的产生有关。同时,在这些细菌中普遍存在的染色体编码药物外排机制极大地促进了抗菌药物的耐药性,也对抗菌药物开发提出了重大挑战^[17-18]。另一方面,青霉素是对 G⁺ 菌敏感的药物。然而,长期接触抗菌药物会伴随多种不良反应的发生,包括过敏反应和细菌耐药性。而清消五味汤对 G⁺ 菌具有很好的抑制作用,在临床上可以代替青霉素,在一定程度上减少抗菌药物的使用和细菌耐药性产生。

综上所述,清消五味汤最优提取工艺为料液比 1:10 kg/L,乙醇浓度为 75%,提取时间为 1.5 h,提取次数为 3 次。优化后所得的清消五味汤醇提取工艺稳定、可行,可为清消五味汤进一步的临床应用提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- ZHANG Q, LI X, LI J, et al. Mechanism of anti-inflammatory and antibacterial effects of QingXiaoWuWei Decoction based on network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experiments [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 678685. DOI: 10.3389/fphar.2021.678685.
- CHAWLA G, RANJAN C, KUMAR J, et al. Chemical modifications of Ketoprofen (NSAID) in search of better lead compounds: a review of literature from 2004–2016 [J]. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, 2017, 15 (3): 154–177. DOI: 10.2174/1871523016666170217094722.
- BINDU S, MAZUMDER S, BANDYOPADHYAY U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 180: 114147. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114147.
- ZAPPAVIGNA S, COSSU A M, GRIMALDI A, et al. Anti-inflammatory drugs as anticancer agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (7): DOI: 10.3390/ijms21072605.
- HARRIS R E, BEEBE-DONK J, DOSS H, et al. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review) [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13 (4): 559–583. DOI: 10.1016/S0022-5347(01)68393-9.
- SCHJERNING A M, McGETTIGAN P, GISLASON G. Cardiovascular effects and safety of (non-aspirin) NSAIDs [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17 (9): 574–584. DOI: 10.1038/s41569-020-0366-z.
- GROSSER T, RICCIOTTI E, FitzGERALD G A. The cardiovascular pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38 (8): 733–748. DOI: 10.1016/j.tips.2017.05.008.
- WANG L F, LI H T, CHEN Q Y, et al. Research progress on antibacterial activity of herbal volatile oil [J]. *China J Chinese Mater Med*, 2021, 46 (5): 1026–1033. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20201123.603.
- MA H, HUANG Q, QU W, et al. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory effects of *Sophora flavescens* residues [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 224: 497–503. DOI: 10.1016/j.jep.2018.06.019.
- ESPINOSA A, PAZ-Y-MiNO-C G, SANTOS Y, et al. Anti-amebic effects of Chinese rhubarb (*Rheum palmatum*) leaves' extract, the anthraquinone rhein and related compounds [J]. *Heliyon*, 2020, 6 (4): e03693. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03693.
- ZHONG J, LIU Z, ZHOU X, et al. Synergic anti-pruritus mechanisms of action for the *Radix Sophorae Flavescentis* and *Fructus Cnidii* herbal pair [J]. *Molecules*, 2017, 22 (9): DOI: 10.3390/molecules22091465.
- CHEN L L, ZHANG H J, CHAO J, et al. Essential oil of *Artemisia argyi* suppresses inflammatory responses by inhibiting JAK/STATs activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 204: 107–117. DOI: 10.1016/j.jep.2017.04.017.
- JIANG Y, WEN J, ZHANG W, et al. Metabolomics coupled with integrative pharmacology reveals the therapeutic effect of l-borneolum against cerebral ischaemia in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72 (9): 1256–1268. DOI: 10.1111/jphp.13294.
- NAKATSUJI T, CHEN T H, NARALA S, et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9 (378): eaah4680. DOI: 10.1126/scitranslmed.aah4680.
- 靳颖, 张华, 吴玉秀, 等. 2018–2020 年某医院主要耐药菌监测分析 [J]. *实用检验医师杂志*, 2022, 14 (1): 39–42. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2022.01.010.
- 黄忠义, 马淑青, 孙梅, 等. 428 株呼吸道革兰阳性菌的临床分布及耐药性趋势分析 [J]. *实用检验医师杂志*, 2019, 11 (2): 72–74. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.02.003.
- 丁阳阳, 陈益, 庄鸣阳, 等. 载银二氧化钛对金黄色葡萄球菌生物被膜抑制作用的研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (6): 736–739. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200518-00390.
- LI X Z, PLESIAAT P, NIKAIIDOikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28 (2): 337–418. DOI: 10.1128/CMR.00117-14.

(收稿日期: 2022-04-13)

(本文编辑: 邵文)